不同饲养密度对笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群的影响

于江明　王秋菊*　刘勃麟　宁博林　王　龙　赵乾雨　刘胜军**　全佳慧

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院，大庆 163319)

摘　要：本试验采用聚合酶链式反应(PCR)-变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法探究不同饲养密度对笼养海兰灰蛋鸡十二指肠肠道菌群的影响。随机选取 1 250 只 11 周龄海兰灰蛋鸡，按照不同饲养密度随机分为 5 个组：A 组 900 cm^2/只、B 组 675 cm^2/只、C 组 540 cm^2/只、D 组 450 cm^2/只、E 组 380 cm^2/只，每个组内 50 个重复。5 个组均在相同的环境和饲养管理模式下进行饲养。分别于 16、26、50 周龄时，在每个组中随机选取 5 只鸡，取十二指肠内容物，用 PCR-DGGE 法进行肠道菌群分析。结果表明，在同一个饲养密度内，随着饲养周龄的增加笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构相似系数逐渐减小；16 周龄时高密度组与低密度组之间十二指肠肠道菌群结构相似性很高，即肠道菌群结构差异较小；26 和 50 周龄时高密度组与低密度组之间十二指肠肠道菌群结构相似性很低，即肠道菌群结构差异很大。由此可见，随着饲养周龄的增加笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构差异增大；2 种有益菌(*Lactobacillus gastricus* 和 *Lactobacillus alvi*)在高饲养密度组（D 组和 E 组）中消失，饲养密度高于 450 cm^2/只对笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构具有不利的影响。

关键词：蛋鸡；饲养密度；十二指肠细菌菌群；PCR-DGGE

中图分类号：S831　　　　　　　文献标识码：　　　　　　　文章编号：

随着家禽集约化养殖程度的越来越高，饲养密度成为家禽养殖中普遍存在的应激因素[1]。王龙[2]研究了不同饲养密度对层叠笼养蛋鸡生产性能及福利的影响，结果显示随着饲养密度增加，鸡群受到的应激刺激增大，鸡群羽毛覆盖程度差，血液皮质酮水平增高，入舍鸡产蛋数降低，鸡群死亡率升高，高密度饲养严重影响蛋鸡的生产性能。应激条件下，除了影响家禽外在的羽毛状态和生产性能外，对其内部肠道健康也有重要的影响[3]。肠道微生物区系是评价肠道健康的重要指标，肠道微生物对宿主的营养物质消化、吸收、免疫等均起重要作用[4]。小肠是肠道中重要的吸收部位，90%的食物在小肠中被吸收；而十二指肠是小肠中管径最大、位置最深、最为固定的小肠段，且胰管与胆总管均开口于十二指肠，因此十二指

收稿日期：2015-09-09
基金项目：黑龙江省自然科学基金（C2015040）；黑龙江省教育厅创新团队项目（NO.2010td05）
作者简介：于江明（1992-），女，黑龙江海伦人，硕士研究生，养殖专业，E-mail：1293815530@qq.com
*同等贡献作者
**通信作者：刘胜军，教授，博士生导师，E-mail：lsj4396@163.com

肠的健康直接影响动物机体的健康。研究饲养密度对蛋鸡十二指肠细菌菌群结构的影响，对探究家禽机体内部影响蛋鸡健康状况的作用机理至关重要。关于肠道细菌结构的研究，以往的微生物纯培养方法只能体外培养 10%~60%的细菌[5]，该方法不能完整、准确的描述肠道菌群结构，因此逐渐被淘汰；变性梯度凝胶电泳（DGGE）和聚合酶链式反应（PCR）等基于 16S 核糖体（rRNA）基因为基础的分子技术的发展，加快了对肠道微生物区系的检测和认知[6-7]，因此目前多采用更加快速和细致的 PCR-DGGE 方法分析肠道菌群结构。关于 DGGE 方法检测胃肠道细菌结构的应用已非常广泛，但该技术在家禽肠道菌群结构分析的应用仍在初期，关于蛋鸡肠道菌群变化的研究很少，研究饲养密度应激对蛋鸡十二指肠肠道菌群结构的影响未见报道。因此，本研究通过采用 PCR-DGGE 技术分析不同饲养密度对笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构的影响，从家禽肠道健康角度来反映饲养密度对蛋鸡产生的应激，为蛋鸡肠道微生物区系的全面分析奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　试验动物及设计

随机选取 1 250 只 11 周龄海兰灰（Hy-Line Gray）蛋鸡（由黑龙江兴和生物科技有限公司提供），饲养笼尺寸(长×宽×高)为 600 mm×450 mm×430 mm，按照不同饲养密度随机分为 5 个组：A 组 900 cm^2/只（3 只/笼）、B 组 675 cm^2/只（4 只/笼）、C 组 540 cm^2/只（5 只/笼）、D 组 450 cm^2/只（6 只/笼）、E 组 380 cm^2/只（7 只/笼），每个组内 50 个重复，所有鸡只饲养在同一层笼中，即距离地面第 2 层。整个试验周期 5 个组均在同一环境和饲养管理模式下进行饲养。

1.1.2　试验样品采集与处理

于 16、26、50 周龄时进行采样。即每个组的每 15 个重复随机挑选 1~2 个重复，每个重复选取 5 只鸡，进行采样。对于密度小的组（3、4 只/笼），选 6 个重复，每 2 个重复选取 5 只鸡。将选取的试验鸡，剪断颈静脉处死，无菌操作，剖腹分离十二指肠。将每个重复 5 只鸡的十二指肠内容物均匀混合后装入 1 个 15 mL 离心管内，编号，-80 ℃保存备用。表 1 为十二指肠内容物样品编号。

表 1　十二指肠内容物样品编号

Table 1　Number of the contents of duodenum

项目 Items	组别 Groups														
	A			B			C			D			E		
周龄 Weeks of age	16	26	50	16	26	50	16	26	50	16	26	50	16	26	50
编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

1.2 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

采用 CTAB 手提法进行各内容物样品的 DNA 提取，以样品基因组 DNA 为模板，采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列，引物信息见表 2。

表 2 引物信息

Table 2 primer information

引物名称 Primer name	序列 Sequence
338F	CCT ACG GGA GGC AGC AG
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG
GC338F	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGGGGGCGCGGGGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG

PCR 扩增体系（50 μL）为：10×PCR buffer 5 μL；dNTP（2.5 mmol/L）3.2 μL；rTaq（5 U/μL）0.4 μL；GC-338F（20 μmol/L）1 μL；518R（20 μmol/L）1 μL；模板 DNA 50 ng；补 ddH_2O 至 50 μL。

PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，55 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min。

1.3 PCR 产物的 DGGE 分析

取 10 μL PCR 的产物进行 DGGE 分析。采用变性梯度为 35%～55%、浓度为 7%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE 缓冲液中 150 V、60 ℃下电泳 5 h。DGGE 完毕后采用银染法染色。

1.4 DGGE 图谱中优势条带的回收与测序

用灭菌的手术刀切下待回收 DGGE 条带，采用 OMEGA 公司 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收目的条带。以 2 μL 回收产物为模板，338F/518R 为引物进行 PCR 扩增。

将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后，连接到 Pmd18-T 载体上，并转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆，菌液由华大基因对插入的细菌 16S rDNA 片段进行序列测定。

1.5 数据分析

在 GenBank 中使用 Blast 程序进行同源性比较，获得最相似典型菌株的 16S rDNA 序列。采用 MEGA 5 软件，Neighbor-joining 法构建系统发育树，自展数（bootstrap）为 1 000。

细菌多样性指数是研究群落物种数和个体数以及均匀度的综合指标。根据电泳图谱中样品条带数目及每个条带的强度（灰度），对各样品中细菌多样性指数（H）、均匀度（E）和丰富度（S）等指标进行分析。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

以 GC-338F 和 518R 为引物扩增 16S rDNA 序列，各条带均获得 250 bp 左右的 DNA 片段（图 1），可以用于 DGGE 分析。

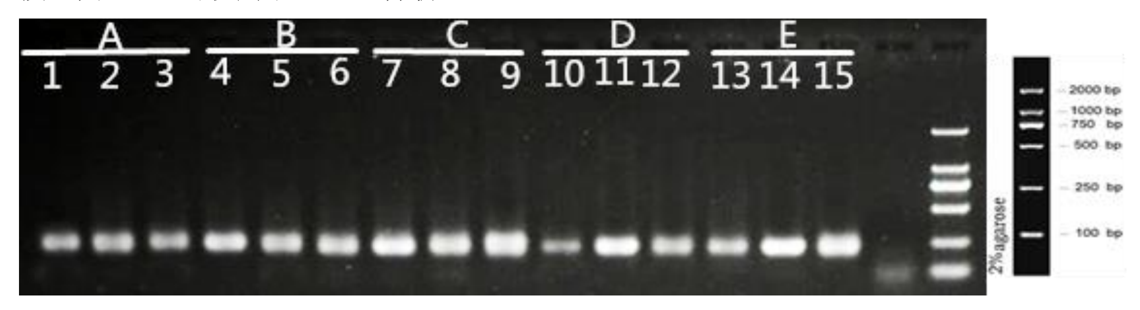


图 1 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results

2.2 PCR 产物的 DGGE

样品 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 分析结果见图 2。图 2 所示的每条泳道的样品均是 5 只鸡十二指肠肠道内容物的混合物，所以它反映的是不同组别之间十二指肠肠道菌群的平均状态。图 2 中不同位置的条带代表不同的细菌；条带的数量反映的是十二指肠肠道细菌种群的数量，条带的数量越多，表示种群的数量越多，反之亦然；某一条带的亮度和粗细反映的是十二指肠肠道某一种群细菌的数量，越粗越亮，表示该种群细菌的数量越多，反之亦然。图中不同泳道的条带位置、数量、亮度及粗细的差异表明同一周龄下不同饲养密度之间和同一饲养密度下不同周龄之间蛋鸡十二指肠肠道菌群的结构组成均存在差异。

图 3 下方的百分比表示以 1 组样品为标准，其他各组样品与其整体的相似度。其中，3 组样品与 1 组样品的整体相似度最高为 48.2%，14 组样品与 1 组样品的整体相似度最低为 19.3%，说明各组之间菌群相似度较低，差异较大。由图 3 可知，1~15 组样品中含有的条带数目分别是 17 条、14 条、22 条、22 条、15 条、22 条、14 条、15 条、18 条、12 条、17 条、22 条、24 条、14 条、21 条。1~15 组样品没有完全共有的条带，说明菌群结构存在差异。

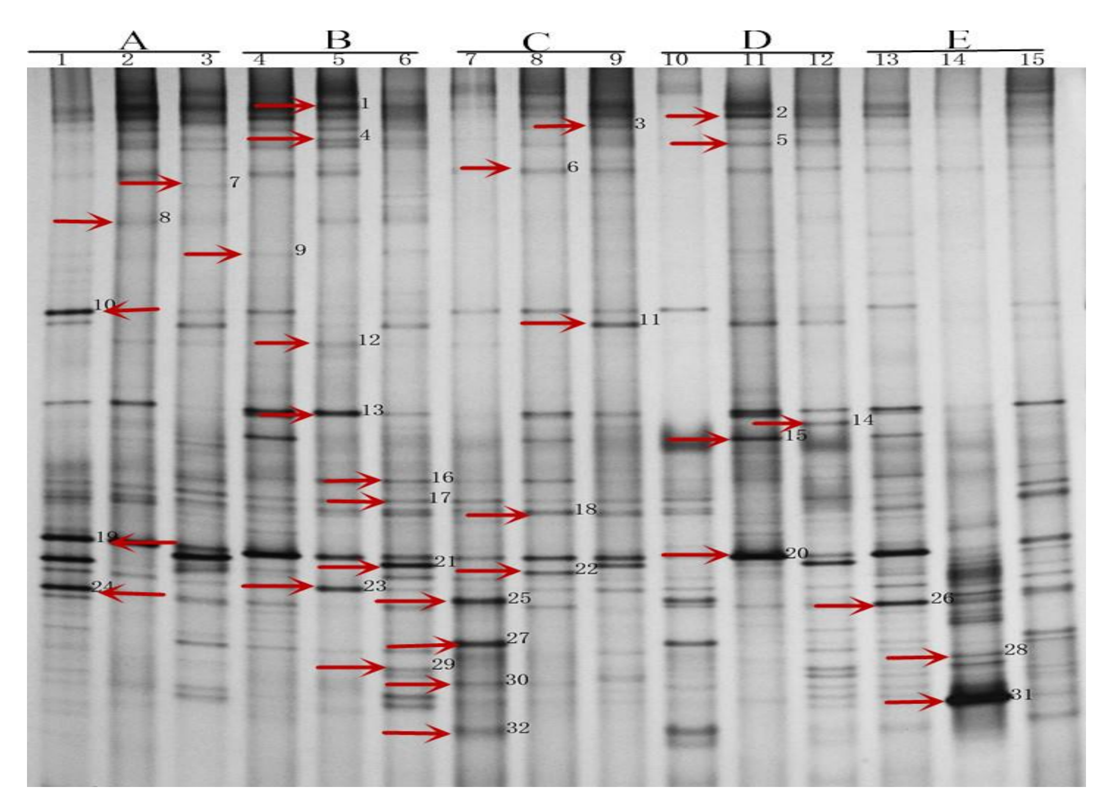


图 2　电泳分析结果（图谱中条带旁边数字为切胶编号）

Fig.2　Electrophoresis analysis results (the data besides band represent the gel extraction number)

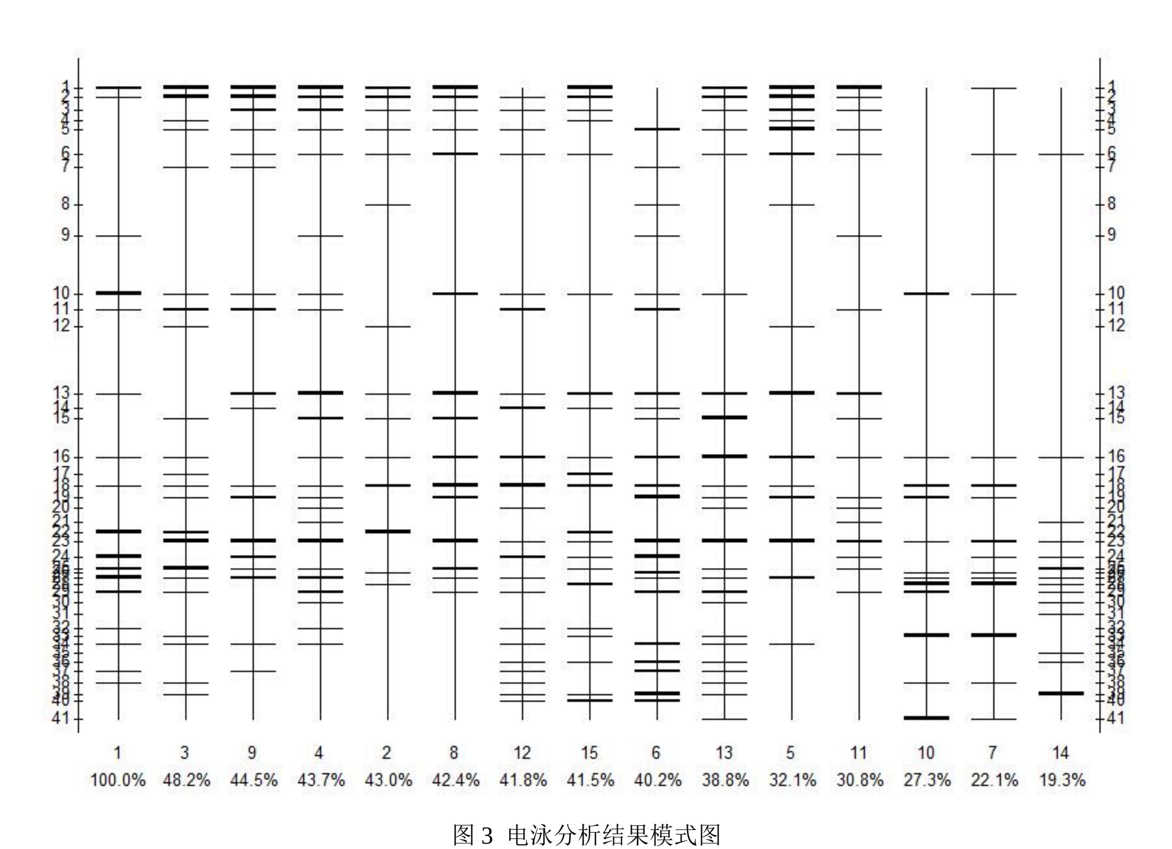


图 3 电泳分析结果模式图

Fig.3　Model of electrophoresis analysis results

2.3 各样品之间的细菌群落结构相似性

由表 3 可知，同一饲养密度条件下不同周龄内笼养蛋鸡十二指肠菌群结构相似指数在 12.1%~64.5%之间，其中 6 只/笼的试验组 16 与 26 周龄的菌群结构相似性最低，相似系数仅为 12.1%；4 只/笼的试验组 16 与 26 周龄的菌群结构相似性最高，相似系数为 64.5%。整体来看，在同一个饲养密度内，随着饲养周龄的增加笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构相似系数逐渐减小，肠道菌群结构差异逐渐增加，即饲养周龄对蛋鸡十二指肠肠道菌群结构影响很大。

同一周龄条件下不同饲养密度内笼养蛋鸡十二指肠菌群结构相似指数在 6.0%~70.3%之间，其中 26 周龄时 B 组与 E 组的菌群结构相似性最低，相似系数为 5.4%；16 周龄时 B 组与 E 组的菌群相似性最高，相似系数为 70.3%。总体来看，16 周龄时高密度组与低密度组之间十二指肠肠道菌群结构相似性很高，即肠道菌群结构差异较小；26 和 50 周龄时高密度组与低密度组之间十二指肠肠道菌群结构相似性很低，即肠道菌群结构差异很大。

表 3　PCR-DGGE 图谱的相似性系数

Table 3　Resemblance coefficient of PCR-DGGE map　%

泳道 Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100	43.0	48.2	43.7	32.1	40.2	22.1	42.4	44.5	27.3	30.8	41.8	38.8	19.3	41.5
2	43.0	100	38.8	37.4	39.8	19.2	27.0	40.2	34.6	17.0	42.5	32.2	33.2	6.0	49.5
3	48.2	38.8	100	57.7	51.3	37.9	31.1	60.2	55.9	28.3	46.2	35.4	52.5	20.6	49.9
4	43.7	37.4	57.7	100	64.5	38.8	27.3	72.6	64.6	27.7	61.1	40.9	70.3	17.7	40.9
5	32.1	39.8	51.3	64.5	100	36.3	27.0	67.6	65.9	23.9	47.8	34.9	51.7	5.4	38.4
6	40.2	19.2	37.9	38.8	36.3	100	25.7	43.4	49.7	33.5	25	48.7	43.6	21.7	25.0
7	22.1	27.0	31.1	27.3	27.0	25.7	100	31.7	28.0	69.8	23.2	29.0	33.6	14.0	35.1
8	42.4	40.2	60.2	72.6	67.6	43.4	31.7	100	60.7	37.6	54.4	42.5	64.7	19.2	46.3
9	44.5	34.6	55.9	64.6	65.9	49.7	28.0	60.7	100	23.4	51.8	51.5	49.3	9.6	42.5
10	27.3	17.0	28.3	27.7	23.9	33.5	69.8	37.6	23.4	100	12.1	26.0	33.5	15.5	26.4
11	30.8	42.5	46.2	61.1	47.8	25.0	23.2	54.4	51.8	12.1	100	36.4	49.7	14.2	44.3
12	41.8	32.2	35.4	40.9	34.9	48.7	29.0	42.5	51.5	26.0	36.4	100	42.8	18.3	40.4
13	38.8	33.2	52.5	70.3	51.7	43.6	33.6	64.7	49.3	33.5	49.7	42.8	100	19.9	37.9
14	19.3	6.0	20.6	17.7	5.4	21.7	14.0	19.2	9.6	15.5	14.2	18.3	19.9	100	21.1
15	41.5	49.5	49.9	40.9	38.4	25.0	35.1	46.3	42.5	26.4	44.3	40.4	37.9	21.1	100

2.4　主要电泳条带的序列测定

DGGE 凝胶条带回收后，以 338F/518R 为引物进行 PCR 扩增，获得目的 DNA 片段。PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上，转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆测序。

测序结果与 GenBank 中的序列进行比对，得到条带所代表的细菌类型。每个回收条带选取 3 个克隆进行了序列测定，结果见表 4。32 个测序结果中，微生物的同源性在 84%~100%

之间，大多数均大于 98%，10 个条带的同源性达到了 100%，仅 6 个条带的同源性小于 98%，其中条带 30 与数据库中 *Pediococcus siamensis* 菌株的相似度仅为 84%，因此该序列代表的微生物可能为厚壁菌门（Firmicutes）新种。各组样品中检测到 26 种厚壁菌门细菌、5 种蛋白菌门（Proteobacteria）细菌、1 种放线菌门（Actinobacteria）细菌，由此可以看出，蛋鸡十二指肠肠道内的优势菌群为厚壁菌门。第 28 号 *Pseudomonas japonica* 细菌仅第 14 组所特有；第 16 号 *Lactobacillus equi* 细菌是除第 9 组之外其他各组的共有菌；第 7 号 *Romboutsia ilealis* 细菌、第 8 号 *Lactobacillus gastricus* 细菌、第 9 号 *Lactobacillus vaginalis* 细菌、第 10 号 *Lactobacillus alvi* 细菌随着饲养密度的增加逐渐消失；第 17 号 *Lactobacillus equi* 细菌和第 19 号 *Enterococcus cecorum* 细菌在最高密度组中和最低密度组中均检测到。

表 4　序列比对分析结果

Table 4　Sequence bipartition analytic results

编号 Number	最相似菌株名称 The closest strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性 Homology/%	最相似类群 The most similar groups
1	*Lactobacillus salivarius*	NR_028725	99	Firmicutes
2	*Gemmiger* ·	NR_104846	98	Firmicutes
3	*Ruminococcus faecis*	NR_116747	99	Firmicutes
4	*Lactobacillus salivarius*	NR_028725	99	Firmicutes
5	*Lactobacillus crispatus*	NR_119274	99	Firmicutes
6	*Lactobacillus vaginalis*	NR_041796	99	Firmicutes
7	*Romboutsia ilealis*	NR_125597	100	Firmicutes
8	*Lactobacillus gastricus*	NR_029084	99	Firmicutes
9	*Lactobacillus vaginalis*	NR_041796	100	Firmicutes
10	*Lactobacillus salivarius*	NR_028725	94	Firmicutes
11	*Lactobacillus crispatus*	NR_119274	100	Firmicutes
12	*Lactobacillus alvi*	NR_118032	99	Firmicutes
13	*Lactobacillus johnsonii*	NR_075064	100	Firmicutes
14	*Lactobacillus intestinalis*	NR_117071	100	Firmicutes
15	*Lactobacillus vaginalis*	NR_041796	100	Firmicutes
16	*Lactobacillus equi*	NR_028623	96	Firmicutes
17	*Lactobacillus equi*	NR_028623	96	Firmicutes
18	*Lactobacillus satsumensis*	NR_028658	95	Firmicutes
19	*Enterococcus cecorum*	NR_024905	99	Firmicutes
20	*Lactobacillus crispatus*	NR_119274	99	Firmicutes
21	*Lactobacillus delbrueckii*	NR_117074	99	Firmicutes
22	*Lactobacillus hayakitensis*	NR_041498	95	Firmicutes
23	*Lactobacillus salivarius*	NR_074589	100	Firmicutes

24	*Lactobacillus acidophilus*	NR_075049	99	Firmicutes
25	*Shigella sonnei*	NR_074894	99	Proteobacteria
26	*Acinetobacter johnsonii*	NR_044975	100	Proteobacteria
27	*Shigella dysenteriae*	NR_074892	99	Proteobacteria
28	*Pseudomonas japonica*	NR_040992	100	Proteobacteria
29	*Faecalicoccus pleomorphus*	NR_044660	92	Firmicutes
30	*Pediococcus siamensis*	NR_041458	84	Firmicutes
31	*Aeriscardovia aeriphila*	NR_042759	99	Actinobacteria
32	*Shigella sonnei*	NR_074894	100	Proteobacteria

采用 MEGA 5 软件，Neighbor-joining 法构建系统发育树，自展数（bootstrap）为 1 000，系统发育树如图 4：

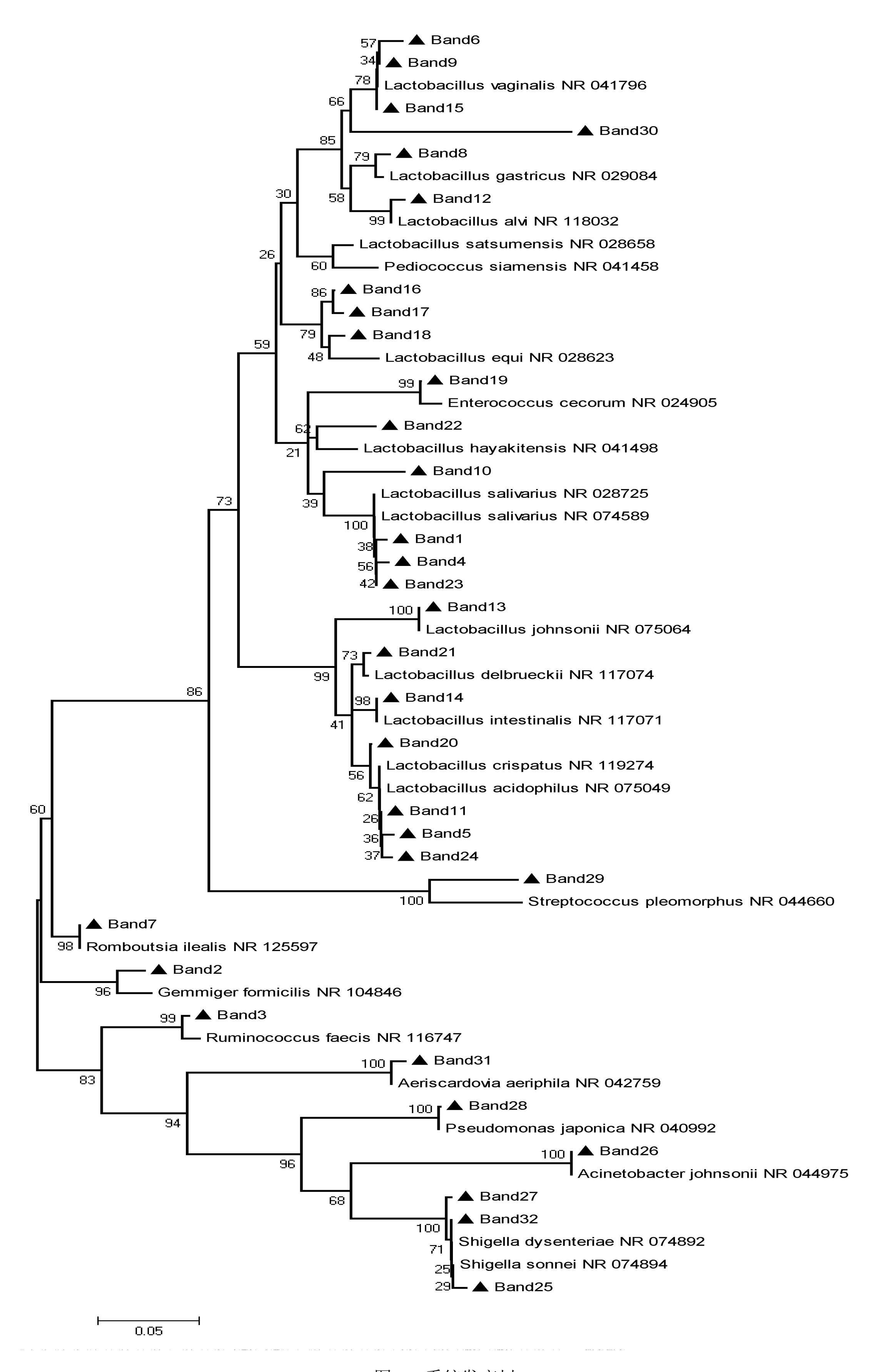


图 4　系统发育树

Fig.4　Phylogenetic trees

3 讨 论

家禽生长发育过程中，肠道微生物菌群会产生各种对机体有利或有害的代谢产物，菌群和胃肠道上皮细胞之间的相互作用导致消化道各种结构和功能的改变，菌群不仅可以影响脂肪的消化和改变碳水化合物、蛋白质的消化，还能够增加能量和蛋白质的需要量，但对维生素的消化吸收具有负面的影响，此外，有益菌可以保护机体免受病原菌的侵入，是肠道免疫系统的一部分，所以说，肠道微生物区系对肠道功能起着至关重要的作用[8]。

肠道微生物的组成复杂，数量和种类因家禽的种类、年龄[9]、饲料和环境[10]而异，即使在相同饲养环境下的不同个体肠道菌群结构也存在差异，为了减小个体差异对试验的影响，本试验在每个组中都随机选取 3~6 个重复，每个重复选取 5 只笼养蛋鸡，提取十二指肠内容物进行检测，使试验数据更准确，提高 PCR-DGGE 图谱的相似性。然而本试验不同饲养密度蛋鸡十二指肠肠道菌群的共有菌仅 1 株，即第 16 号 *Lactobacillus equi* 细菌，由此可见，饲养环境即使相同，鸡只肠道菌群仍存在很大差异，分析原因可能与本试验鸡群是大群饲养（30 000 只，5 层笼）、饲养空间的大小和鸡群群体大小对肠道菌群都产生影响有关。但各鸡十二指肠的共同菌即第 16 号 *Lactobacillus equi* 细菌曾作为日本赛马粪便中的优势菌群被报道[11-12]，说明该细菌为十二指肠肠道菌群的优势菌，并且表明该优势菌群不受饲养周龄和饲养环境的影响。第 19 号 *Enterococcus cecorum* 细菌是一种致病菌，大量的试验表明该细菌可以导致家禽产生关节炎及骨髓炎[13-15]，本试验中在最低密度 A 组和最高密度 E 组中均检测到该细菌，说明过高或过低的密度对十二指肠肠道菌群结构均有影响。大量试验研究指出，第 8 号 *Lactobacillus gastricus* 细菌[16-17]和第 10 号 *Lactobacillus alvi* 细菌[18]是可以维护肠道平衡，防止病原菌入侵的有益菌，但在本试验中这 2 种细菌均随着饲养密度的增加而消失，说明饲养密度对十二指肠肠道菌群有影响，过高的饲养密度对其有不利的影响。

有研究显示，肠道中的有益菌可以在保证鸡蛋蛋重不变的情况下增加蛋壳的重量并提高蛋壳强度[19]。有益菌也可以通过改变有害菌的受体，从而阻断其在消化道中的生长，总体而言，饲养密度或热应激的增加会加大有害菌对有益菌的损害[10]。倪学勤等[20]采用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡年龄和肠段部位对微生物群落结构和多样性的影响，结果表明蛋鸡肠道部位决定细菌群落的结构和多样性，蛋鸡的周龄影响肠道细菌多样性；倪学勤等[21]通过 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡主要组织相容性复合体（*MHC*）基因对肠道细菌种群结构的

影响，得出蛋鸡盲肠细菌的多样性最高，其次是回肠和空肠，嗉囊和十二指肠的细菌多样性比较低，且随着蛋鸡周龄增加，各肠段细菌多样性呈上升趋势；李永洙等[22]通过 PCR-DGGE 技术分析不同品种、饲养阶段的健康和不良鸡群对盲肠细菌种群结构和多样性的影响，结果显示，不同品种、饲养阶段的鸡群，其盲肠细菌群落的组成差异显著，并且细菌种群结构对鸡群的生长发育影响较大；王秋菊等[23]采用 PCR-DGGE 技术分析笼养海兰褐蛋雏鸡肠道菌群，得出同龄笼养海兰褐蛋雏鸡肠道细菌菌群结构与肠道的不同部位有关，各肠段中细菌菌群的组成差异很大。在正常蛋鸡饲养过程中，开产前与开产后蛋鸡饲粮配方不同，可能会影响蛋鸡肠道细菌组成。但本试验结果显示，16 周龄时，不同饲养密度下笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构差异不显著；饲喂同一饲粮的 26 和 50 周龄蛋鸡，不同饲养密度下笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构差异显著，说明日龄对蛋鸡肠道菌群产生影响；而且同一个饲养密度下，随着饲养时间的延长，笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构相似系数逐渐减小，肠道菌群结构差异逐渐增加，即饲养时间对蛋鸡十二指肠肠道菌群结构影响很大。

4　结　论

① 饲养密度对笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群产生影响，随着饲养密度增加，即饲养密度高于 450 cm^2/只时，笼养蛋鸡十二指肠中有益菌(*Lactobacillus gastricus* 和 *Lactobacillus alvi*)消失，对肠道菌群平衡产生不利影响。

② 在同一个饲养密度下，随着饲养时间的延长，笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群结构相似系数逐渐减小，肠道菌群结构差异逐渐增加，即随着饲养周龄增加，蛋鸡十二指肠肠道菌群结构发生差异变化。

参考文献：

[1]　ONBAŞILAR E E,AKSOY F T.Stress parameters and immune response of layers under different cage floor and density conditions[J].Livestock Production Science,2005,95(3):255–263.

[2]　王龙.饲养密度对层叠笼养蛋鸡生产性能以及福利影响[D].硕士学位论文.大庆:黑龙江八一农垦大学,2015:25–29.

[3]　SOHAIL M U,HUME M E,BYRD J A,et al.Molecular analysis of the caecal and tracheal microbiome of heat-stressed broilers supplemented with prebiotic and probiotic[J].Avian Pathology,2015,44(2):67–74.

[4] ROBERTS T,WILSON J,GUTHRIE A,et al.New issues and science in broiler chicken intestinal health:intestinal microbial composition,shifts,and impacts[J].World's Poultry Science Journal,2015,71(2):259–270.

[5] GONG J H,SI W D,FORSTER R J,et al.16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts:from crops to ceca[J].FEMS Microbiology Ecology,2007,59(1):147–157.

[6] JANCZYK P,HALLE B,SOUFFRANT W.Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*[J].Poultry Science,2009,88(11):2324–2332.

[7] KIM G B,SEO Y M,KIM C H,et al.Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance,intestinal microflora,and immune response of broilers[J].Poultry Science,2011,90(1):75–82.

[8] GABRIEL I,LESSIRE M,MALLET S,et al.Microflora of the digestive tract:critical factors and consequences for poultry[J].World's Poultry Science Journal,2006,62(3):499–511.

[9] KNARREBORG A,SIMON M A,ENGBERG R M,et al.Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages[J].Applied and Environmental Microbiology,2002,68(12):5918–5924.

[10] SUZUKI K,KODAMA Y,MITSUOKA T.Stress and intestinal flora[J].Bifidobacteria and Microflora,1989,8(1):23–38.

[11] ENDO A,OKADA S,MORITA H.Molecular profiling of *Lactobacillus*,*Streptococcus*,and *Bifidobacterium* species in feces of active racehorses[J].Journal of General and Applied Microbiology,2007,53(3):191–200.

[12] ENDO A,ROOS S,SATOH E,et al.*Lactobacillus equigenerosi* sp.nov.,a coccoid species isolated from faeces of thoroughbred racehorses[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2008,58(4):914–918.

[13] BORST L B, SUYEMOTO M M,SHIVARAMU K,et al.A chicken embryo lethality assay for pathogenic *Enterococcus cecorum*[J].Avian Diseases,2014,58(2):244–248.

[14] KENSE M J,LANDMAN W J M.*Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring:molecular epidemiology[J].Avian Pathology,2011,40(6):603–612.

[15] BOERLIN P,NICHOLSON V,BRASH M,et al.Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens[J].Veterinary Microbiology,2012,157(3/4):405–411.

[16] CÁRDENAS N,MARTÍN V,DELGADO S,et al.Characterisation of *Lactobacillus gastricus* strains isolated from human milk[J].International Dairy Journal,2014,39(1):167–177.

[17] MARTÍN V,CÁRDENAS N,JIMÉNEZ E,et al.Genome sequence of *Lactobacillus gastricus* PS3,a strain isolated from human milk[J].Genome Announcements,2013,1(4): e00489–13,doi: 10.1128/genomeA.00489-13..

[18] KIM H J,EOM S J,PARK S J,et al.*Lactobacillus alvi* sp.nov.,isolated from the intestinal tract of chicken[J].FEMS Microbiology Letters,2011,323(1):83–87.

[19] PANDA A K,REDDY M R,RAMARAO S V,et al.Effect of dietary supplementation of probiotic on performance and immune response of layers in the decline phase of production[J].Indian Journal of Poultry Science,2000,35(1):102–104.

[20] 倪学勤,GONG J,YU H,等.采用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性[J].畜牧兽医学报,2008,39(7):955–961.

[21] 倪学勤,GONG J,YU H,等.PCR-DGGE 技术分析蛋鸡 MHC 基因对肠道细菌种群结构的影响[J].中国农业科学,2009,42(7):2564–2571.

[22] 李永洙,CUI Y Q.利用 PCR-DGGE 方法分析不同鸡群的盲肠微生物菌群结构变化[J].生态学报,2011,31(21):6513–6521.

[23] 王秋菊,崔一喆,刘胜军,等.笼养海兰褐蛋雏鸡肠道菌群的聚合酶链式反应—变性梯度凝胶电泳分析[J].动物营养学报,2014,26(2):504–512.

Effects of Different Stocking Density on Microbial Flora of Duodenum for Caged Layer

YU Jiangming WANG Qiuju* LIU Bolin NING Bolin WANG Long ZHAO Qianyu LIU Shengjun** QUAN Jiahui

（*College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing* 163319）

Abstract: The test used the polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) methods to explore the effects of different stocking density on the microbial flora of duodenum for caged Hy-line Gray laying hens. A total of 1 150 eleven-week-old Hy-line Gray laying hens were randomly allocated into 5 groups with 50 replications with the stocking density of 900, 675, 540, 450 and 380 cm^2 per layer, respectively. All the hens were reared under the same environment condition and with the same management model. 5 hens were selected randomly from every group at the age of 16, 26 and 50 weeks, the intestinal samples of duodenum were taken to analyze the micro by PCR-DGGE. The results showed that in the same stocking density, the similarity coefficient of duodenum microbial flora of caged layers was decreased with the increasing of breeding weeks; at the 16-week-old, the microbial flora of duodenum was highly similar between high density group and low density group, there was no obvious difference for structure of intestinal flora; at the 26-week-old and 50-week-old, the microbial flora of duodenum was lowly similar between high density group and low density group, there was significant differences for structure of intestinal flora. In conclusion, with the increasing of feeding week age, the structure of the microbial flora of duodenum is changed significantly; two kinds of beneficial bacteria (*Lactobacillus gastricus* and *Lactobacillus alvi*) disappear in high stocking density (group D and group E); the feeding density is higher than 450 cm^2/ per layer have adverse effects on the structure of the microbial flora of duodenum of cage laying hens.

Key words: laying hens; stocking density; microbial flora of duodenum; PCR-DGGE

*Contributed equally
**Corresponding author, professor, E-mail： lsj4396@163.com (责任编辑　武海龙)